



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**  
**ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA**

**“DETERMINACION DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE ACEITES  
ESENCIALES OBTENIDOS DE LA FAMILIA *Myracaceae* y  
*Lamiceae*”**

**Tesis previa a la obtención del  
Título de Bioquímico Farmacéutico.**

**AUTORES:**

María Angélica Zaruma Mochas.  
Juan Pablo Illescas Ortega.

**DIRECTOR:**

Dr. Fabián León Tamaríz.

**ASESORES:**

Dra. María de Lourdes Jerves Andrade.  
Dr. Manuel Guillermo Vega Cuesta

**Cuenca – Ecuador**

**2014**

---

## RESUMEN

La ciencia ha puesto real interés en el uso de sustancias naturales para el control microbiano siendo una de las áreas que se encuentra en auge en la actualidad, entre las plantas están las que producen aceites esenciales. En este trabajo se buscó la actividad antibacteriana de los aceites esenciales extraídos de *Clinopodium tenellum* (Huarimi Poleo), *Morella Parvifolia* (Laurel de cera) sobre las cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922, causantes de enfermedades infecciosas como: gastrointestinales y respiratorias, respectivamente.

De *Clinopodium tenellum*, *Morella Parvifolia*, se obtuvieron los aceites esenciales por medio de la destilación por arrastre de vapor con una trampa de Clevenger. Los cuales fueron analizados mediante cromatografía de gases en base a cinco patrones (alfa-pineno, beta-pineno, linalol, limoneno y mentona).

Para el análisis microbiológico se realizó un screening, utilizando la técnica de microdilución en placa; con la que es posible determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) en la que se basa la actividad o la negatividad de efecto antimicrobiano. Los aceites esenciales de *Clinopodium tenellum* y *Morella Parvifolia* fueron analizados a diferentes concentraciones. El estudio demostró para el aceite esencial de *Clinopodium tenellum* una leve actividad a una concentración de 867.8 µg/ml (CMI 50) sobre *E. coli* y sin actividad sobre *S. aureus*; y el aceite esencial de *Morella Parvifolia* sin actividad, sobre *E. coli* y *S. aureus*.

Palabras claves

Aceites esenciales, *Clinopodium*, *Satureja tenella*, *Morella parvifolia*.

---

## ABSTRACT

Science has real interest in the use of natural substances for microbial control is one of the areas that is booming today, between plants are those that produce essential oils. In this study the antibacterial activity of essential oils extracted from *Clinopodium tenellum* ( Huarmi Pennyroyal ) , *Morella Parvifolia* ( Laurel wax ) on strains of *S. aureus* ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 25922, causing infectious diseases as sought : gastrointestinal and respiratory , respectively.

From *Clinopodium tenellum* , *Morella Parvifolia* , essential oils are obtained by distillation by steam with a Clevenger trap . Which were analyzed by gas chromatography using the following five patterns ( alpha-pinene, beta -pinene , linalool , limonene and menthone ) .

For microbiological analysis, a screening was performed using the microdilution plate , with which it is possible to determine the minimum inhibitory concentration (MIC ) in which the activity or negativity is based antimicrobial effect . The essential oils and *Morella Parvifolia* *Clinopodium tenellum* were analyzed at different concentrations. The study demonstrated for the essential oil of *Clinopodium tenellum* mild activity at a concentration of 867.8 mg / ml ( MIC 50 ) for *E. coli* and no activity on *S. aureus* , and the essential oil of *Morella Parvifolia* no activity on *E. coli* and *S. aureus*.

### Keywords

Essential oils , *Clinopodium* , savory tenella , *Morella parvifolia* .



---

## ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
ÍNDICE.....	4
DEDICATORIA.....	11
AGRADECIMIENTO.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
CAPÍTULO I.....	14
1. MARCO TEORICO.....	15
1.1 ANTECEDENTES.....	15
1.2 PLANTAS A ESTUDIAR.....	16
1.2.1 <i>Clinopodium tenellum</i> (HUARMI POLEO).....	16
1.2.2 <i>Morella Parvifolia</i> (LAUREL DE CERA) .....	17
1.3 ACEITES ESENCIALES.....	18
1.3.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS.....	18
1.3.2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS.....	19
1.3.3 DISTRIBUCIÓN Y LOCALIZACIÓN.....	19
1.3.4 CLASIFICACIÓN .....	20
1.3.5 PRINCIPALES USOS.....	20
1.3.6 MECANISMO DE ACCIÓN.....	21
1.4 Agentes Bacterianos .....	21
1.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
1.4.2 <i>Escherichia coli</i> .....	22
CAPÍTULO II.....	24



---

2. MATERIALES Y METODOS .....	25
2.1 MATERIALES .....	25
2.1.1 ESTÁNDARES.....	25
2.1.2 SOLVENTES.....	25
2.2 RECOLECCIÓN DE LA PLANTA. ....	25
2.2.1 Método.....	25
2.2.1.1 RECOLECCIÓN.....	25
2.2.1.2 SELECCIÓN:.....	25
2.2.1.3 LAVADO.....	25
2.2.1.4 SECADO: .....	26
2.3 EXTRACCION DE LOS ACEITES ESENCIALES .....	26
2.3.1 MÉTODO - DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR:.....	26
2.4 DENSIDAD .....	28
2.4.1 MÉTODO .....	28
2.5 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	28
2.5.1 MÉTODO .....	28
2.5.1.1 Preparación del Aceite Esencial. ....	28
2.5.1.2 Microorganismos.....	29
2.5.1.3 Preparación de medios de cultivo.....	29
2.5.1.4 <i>Cultivo "overnight"</i> .....	29
2.5.1.5 Preparación del inóculo.....	29
2.5.2 Screening .....	29
2.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO .....	31
2.6.1 MÉTODO - CROMATOGRAFIA DE GASES.....	31



---

2.7 Procesamiento estadístico .....	32
CAPÍTULO III.....	34
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	35
3.1 Obtención y caracterización inicial de los aceites esenciales de <i>C. tenellum</i> (Huarmi Póleo) y <i>M. parvifolia</i> (Laurel de Cera). .....	35
3.2 Composición química de los aceites esenciales. ....	37
3.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana. ....	42
CAPÍTULO IV .....	49
CONCLUSIONES.....	50
RECOMENDACIONES. ....	51
ANEXOS.....	52
BIBLIOGRAFÍA.....	56



## UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, María Angélica Zaruma Mochas, autor de la tesis "DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS DE LA FAMILIA *Myracaceae* y *Lamiceae*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 14 de marzo de 2014

María Angélica Zaruma Mochas.  
1900596667

---

*Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999*

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316  
e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103  
Cuenca - Ecuador



## UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, María Angélica Zaruma Mochas, autor de la tesis "DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS DE LA FAMILIA *Myracaceae* y *Lamiceae*", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 14 de marzo de 2014

María Angélica Zaruma Mochas,  
1900596667

---

*Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999*

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail [cdjbv@ucuenca.edu.ec](mailto:cdjbv@ucuenca.edu.ec) casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador





## UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Juan Pablo Illescas Ortega, autor de la tesis "DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS DE LA FAMILIA *Myracaceae* y *Lamiceae*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 14 de marzo de 2014

Juan Pablo Illescas Ortega  
0105773824

---

*Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999*

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316  
e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103  
Cuenca - Ecuador



## UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Juan Pablo Illescas Ortega, autor de la tesis "DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS DE LA FAMILIA *Myracaceae* y *Lamiceae*", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 14 de marzo de 2014

Juan Pablo Illescas Ortega  
0105773824

---

*Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999*

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail [cdjbv@ucuenca.edu.ec](mailto:cdjbv@ucuenca.edu.ec) casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador

## DEDICATORIA

Principalmente a Dios y mis padres, a Dios por prestarme la vida, regalarme la oportunidad de día a día ir cumpliendo cada una de mis metas y por ser mi fortaleza en todo momento, a mis adorados padres María del Carmen y Luis, ya que gracias a sus sabios consejos, su apoyo, su comprensión y con una distancia de por medio fueron parte fundamental de todo el proceso académico, a mis pequeños hermanos Luis y Paul por darme los ánimos y apoyo incondicional, a aquella personita que con su gran paciencia me acompañó en la última etapa de este recorrido, a mis amigos que estuvieron brindándome su apoyo en momentos bueno y malos, siempre con una sonrisa.

**Ma. Angélica**

El presente trabajo lo dedico principalmente a Dios quien me ha dado la oportunidad de estar culminando este anhelo tan importante en mi vida y quien me guía en este largo trayecto de vivir; a mis padres: Manuelito y Marthita por el apoyo incondicional que me han brindado durante toda mi vida, quienes con consejos y con sus experiencias me han inculcado el valor de la vida, del esfuerzo, de la vocación y del amor a lo que se hace, han hecho posible que llegue al día más esperado hasta ahora. A mis hermanos Alex y Diego quienes han sabido comprender este largo camino y que con una voz de aliento me impulsaron a llegar a esta meta. A ti Joha por apoyarme en todo. Y a todas las personas que con alientos, consejos se han sentido orgullosos de mí. A mis tíos, primos y a todos mis amigos

**Juan Pablo**

## **AGRADECIMIENTO**

Queremos agradecer a todas las personas que hicieron posible la culminación de este trabajo, especialmente al Proyecto de plantas medicinales en la persona de nuestro director Dr. Fabián León Tamariz quien con empeño y real interés estuvo siempre al frente de nuestro proyecto. A nuestros asesores la Dra. Lourdes Jerves y al Dr. Manuel Vega quienes hicieron que la investigación se lleve a cabo con éxito.

Un gran agradecimiento a la Coordinadora de proyecto VLIR de plantas medicinales la Dra. Isabel Wilches que nos abrió las puertas de los laboratorios y permitió el uso de los mismos y sus equipos, sin ello no hubiese sido posible las determinaciones y resultados de este trabajo.

A las personas encargadas de los laboratorios la Dra. Nancy Cuzco, Bio. Farm. Andrea Abril, por su apoyo incondicional y por entregar todos sus conocimientos en pro del proyecto.

A nuestros familiares por el apoyo brindado en cada paso que fuimos dando. A nuestros amigos y compañeros. Y a todas las personas que de una u otra manera han hecho posible cumplir con los objetivos que nos hemos planteado al inicio de este trabajo.

---

## INTRODUCCIÓN

Actualmente en el mundo moderno la población crece aceleradamente y con ella también las enfermedades, como por ejemplo, las infecciosas producidas por bacterias, virus, hongos, etc. Según la Dirección Nacional de Vigilancia epidemiológica del MSP del Ecuador, las infecciones respiratorias y gastrointestinales están entre las principales causales de enfermedades en el año 2012. A pesar que existen muchos antibacterianos para su control o tratamiento, el uso irracional de éstos viene generando resistencia microbiana.

En el Azuay, el: “Laurel de cera” (*Morella parvifolia*) y/o “Huarmi poleo” (*Clinopodium tenellum*) tienen un importante uso tradicional que se le atribuye a la acción de curar o mitigar problemas gastrointestinales y pulmonares.

Tomando en cuenta el uso tradicional que se ha dado por décadas a estas plantas hemos considerado realizar un estudio investigativo del *Clinopodium tenellum* y *Morella parvifolia*, atribuyendo su probable efecto antimicrobiano, a los aceites esenciales que estas plantas producen.

Existen diversidades de especies de plantas nativas y endémicas en nuestra provincia y país, que tienen uso tradicional en la población, pero que aún no han sido estudiadas ni documentadas. Es el caso del *Clinopodium tenellum* y *Morella parvifolia*, por ello es necesario dar un aporte a la comunidad científica y dejar precedente de investigación, con estudios proyectados a la búsqueda de nuevas opciones y alternativas para tratar enfermedades infecciosas.



# CAPÍTULO

# I

## 1. MARCO TEORICO

### 1.1 ANTECEDENTES

El Ecuador es destacado como uno de los países biológicamente más ricos del planeta debido al gran pluralismo de sus zonas climáticas, lo que se debe a la ubicación en la zona ecuatorial del planeta (1).

Esto le permite recibir una mayor energía solar, así también añadiéndose factores como la influencia de la cordillera de los Andes, la presencia de las Islas Galápagos, la confluencia de variadas corrientes oceánicas calidad y frías cerca de sus costas.

El afán por conocer las bondades de las plantas medicinales, así como las diferentes afecciones que curan ha sido un tema tratado desde que la humanidad existe (2). Es así que el uso de los aromas y los aceites vegetales data de por lo menos 3500 años A. C., utilizados sobre el cuerpo como elementos curativos, cicatrizantes, etc. En las comunidades indígenas del Ecuador el uso de aceites esenciales ha llegado hasta nuestros días, como un legado de generación en generación (3).

Considerando el medio y la gran variedad de plantas medicinales usadas de forma tradicional, el presente trabajo pretende analizar el potencial antibacteriano presente en dos especies vegetales endémicas de los Andes a través del análisis de sus aceites esenciales, el que se centrará en dos especies específicas: una del género *Clinopodium* de la familia *Lamiaceae* y otra del género *Myrica* correspondiente a la familia *Myricaceae*.

Este criterio es respaldado por la gran cantidad de información sobre el poder antibacteriano mostrado por diversos aceites esenciales de un amplio número de géneros de las especies a analizar, que en estudios demuestran actividades que van desde leve hasta altamente activas (4).

---

## 1.2 PLANTAS A ESTUDIAR

El Ecuador cuenta con más de 16.000 especies de plantas vasculares, de estas 5.172 útiles, 3.118 de ellas son usadas con fines medicinales. El 75% de las plantas medicinales son nativas, el 5% endémicas y el 11% introducidas (5).

Es por ello que para el desarrollo de la investigación se toma en cuenta dos especies endémicas de los Andes, pertenecientes a la familia *Lamiaceae*, *Clinopodium tenellum* (Nombre común: Huarmi poleo) y familia *Myricaceae*, *Morella Parvifolia* (Nombre común: Laurel de cera).

### 1.2.1 *Clinopodium tenellum* (HUARMI POLEO)

**Familia:** *Lamiaceae*

**Género:** *Clinopodium*

**Especies:** *Clinopodium tenellum*

*Clinopodium* comprende 271 especies descritas y de éstas, solo 142 aceptadas en diferente bases de datos de herbarios (6). Varias especies *Clinopodium* se utilizan como hierbas medicinales (7). *Clinopodium tenellum* es una planta endémica de los Andes Ecuatorianos (8).

#### **Descripción botánica.**

Planta herbácea, de tallo rastrero. Hojas pequeñas, opuestas, simples, de forma cordada con margen lobulado. Las hojas y peciolos presentan pelos glandulares cortos, las glándulas se encuentran en toda la superficie del haz y envés. Flores pequeñas labiadas de color violeta, son flores pentámeras con cinco anteras basifijas, presentan pelos en sépalos y pétalos. Ovulo supero y tetra carpelar. (Figura 1). Planta de olor característico, agradable (9).



**USOS:** Infusión o té, empleado para el mal aire, para resfriados en forma tradicional.



Figura 1. *Clinopodium tenellum*

### 1.2.2 *Morella Parvifolia* (LAUREL DE CERA)

**Familia:** *Myricaceae*

**Nombre científico:** *Morella parvifolia* (Benth.) Parra-O.

**Sinónimo:** *Myrica parvifolia* Benth. (10)

**Categoría:** Medicinal. (11)

Se encuentra distribuida de los Andes de Venezuela a Perú (10); a nivel nacional: Azuay, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, El Oro, Loja, Pichincha, Tungurahua. (11)

Habita en una altitud de 1.700 a más de 3.900 msnm., a una temperatura media de 12 a 18°C. Es resistente a heladas y a vientos fuertes. Exigente en luz. Encontrándose en suelos pedregosos, poco profundos y ácidos, no tolera sequias prolongadas y alta contaminación. (12)

#### **Descripción botánica**

Arbusto bajo. Las yemas apicales y crecimientos jóvenes son amarillentos; los tallos son retorcidos, nudosos y de color gris.

Hojas alternas, oblanceoladas, de margen conspicuamente entero, ápice agudo, consistencia coriácea y olor muy aromático.

Flores unisexuales, agrupadas en amentos axiales; los femeninos de mayor tamaño que los masculinos, con ovario supero y bicarpelar; las flores masculinas producen abundante polen amarillo que frecuentemente

cubren las hojas. El fruto, es una pequeña drupa de color verde cubierta de verrugas cerosas. (Figura 2.)

**Usos:** Esta planta tiene propiedades astringentes, antigripales, antidiarreicas y estimulantes. Para obtener estos efectos, se utiliza la raíz, la corteza del tallo, las hojas y la cera extraída de los frutos. Planta muy aromática por los aceites esenciales que posee (13).



*Figura 2. Morella parvifolia*

### 1.3 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales tienen composición generalmente muy compleja, con sustancias aromáticas volátiles, responsables de su aroma. Son sustancias importantes en la industria cosmética, de alimentos y farmacéutica, generalmente extraídas por arrastre con vapor de agua.

#### 1.3.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

Los aceites esenciales son volátiles y son líquidos a temperatura ambiente, con frecuencia tienen una coloración que va desde incoloro-amarillo pálido a verde esmeralda. Son más ligeros que el agua con una densidad entre 0,75 y 0.98 g/cm<sup>3</sup>. Los aceites esenciales cambian rápidamente de un líquido a un estado gaseoso; son fácilmente inflamables y queman con una llama brillante (14).

La mayoría son de olor agradable, aunque algunos de olor relativamente desagradable, ejemplo los del ajo y cebolla (compuestos azufrados) (15).

Son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos habituales, como éter o cloroformo, y alcohol etílico de alta gradación. Son liposolubles y

muy poco solubles en agua, pero son arrastrables por el vapor de agua (16).

### 1.3.2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS

Los componentes de los aceites se clasifican en:

- **No terpenoides.**- En este grupo tenemos sustancias alifáticas de cadena corta, sustancias aromáticas, sustancias con azufre y sustancias nitrogenadas. No son tan importantes como los terpenoides en cuanto a sus usos y aplicaciones.
- **Terpenoides.**- Derivan de unidades de isopreno (C5) unidas en cadena. Los terpenos son una clase de sustancia química que se halla en los aceites esenciales, resinas y otras sustancias aromáticas de muchas plantas (Ej.: pinos y cítricos). Principalmente encontramos en los aceites monoterpenos (C10), aunque también son comunes los sesquiterpenos (C15) y los diterpenos (C20). Pueden ser alifáticos, cíclicos o aromáticos.

Según los grupos funcionales que tengan pueden ser: alcoholes, fenoles, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, hidrocarburos (16).

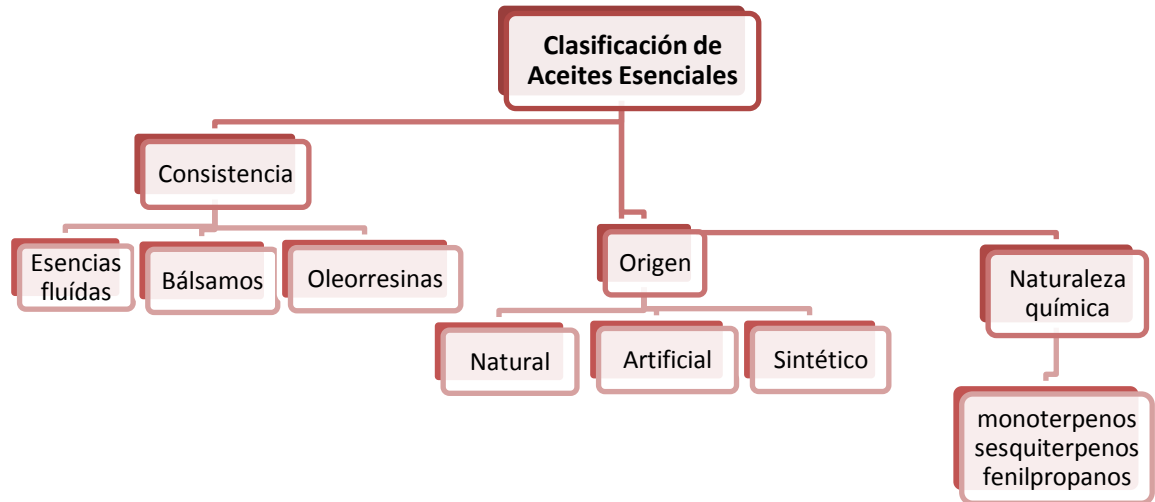
### 1.3.3 DISTRIBUCIÓN Y LOCALIZACIÓN

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, *Lamiaceas*, *Lauráceas*, *Mirtáceas*, *Pináceas*, *Rosáceas*, *Rutáceas*, *Umbelíferas*, etc.

Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en hojas (eucalipto, menta, romero, etc.), las raíces (angélica, valeriana, etc.), el pericarpio del fruto (limón, naranja, etc.), las semillas (anís, comino, etc.), el tallo (canela), las flores (lavanda, manzanilla, rosa, etc.) y los frutos (cilantro, laurel, perejil, etc.). (15)

### 1.3.4 CLASIFICACIÓN

El esquema muestra la clasificación de los aceites esenciales:



*Referencia (15)*

### 1.3.5 PRINCIPALES USOS

Los aceites esenciales tienen múltiples aplicaciones. Son utilizados en la industria cosmética, alimenticia, farmacéutica y, entre otros usos, atribuyéndoseles acciones antibacterianas; antifúngicas; etc. (17).

**Industria farmacéutica.-** Esta es una de las ramas de la industria que más aceites esenciales emplea. Se utilizan en la fabricación de neutralizantes del sabor desagradable de muchos medicamentos. Gracias a su actividad antiséptica, los aceites esenciales son muy usados para problemas de las vías respiratorias; para infecciones urinarias; infecciones de la epidermis; en antisépticos bucales. Además, tienen muchas propiedades saludables como las de ser antiinflamatorios, analgésicos, antibacterianos, antiespasmódicos, entre otras. En términos generales los aceites esenciales se emplean contra enfermedades y en aromaterapia. (18)

### 1.3.6 MECANISMO DE ACCIÓN

La información sobre el mecanismo de acción de los aceites esenciales es escasa. Estos al ser una mezcla compleja de numerosas moléculas con gran diversidad de grupos químicos, es muy probable que la actividad antimicrobiana no se atribuya a un mecanismo específico ya que en las células hay diferentes sitios en donde pueden actuar.

El carácter hidrofóbico de los aceites esenciales les permite introducirse en los lípidos de la membrana bacteriana y mitocondrial, alterando su estructura y permeabilidad, dando lugar a la fuga de iones y otros contenidos celulares, de forma más o menos intensa conduciendo finalmente a la muerte del microorganismo (19).

## 1.4 Agentes Bacterianos

### 1.4.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus*, son bacterias esféricas (cocos) Gram positivas, de 0.5-1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, catalasa y coagulasa positiva, que se encuentran microscópicamente aislados, en pares, tetrámeros formando racimos irregulares. Son inmóviles, facultativamente anaerobios, no formadores de esporas, generalmente no capsulados o con limitada formación de cápsula (20). Son bacterias muy resistentes al calor y desecación. Pueden crecer en medios con elevada salinidad y son de crecimiento rápido (18-24h) (21).

Tiene una amplia gama de determinantes de virulencia. Casi todas las cepas producen un grupo de enzimas y citotoxinas que incluyen 4 hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta) nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas y colagenasa, siendo su principal función convertir tejidos del huésped en nutrientes requeridos para el desarrollo bacteriano.

*S. aureus*, está asociada con una forma de gastroenteritis que se manifiesta clínicamente por un cuadro de vómitos y diarrea, por su corto

período de incubación de (1-6 horas) orienta a la sospecha de enfermedad producida por ingestión de una o más enterotoxinas preformadas en el alimento que ha sido contaminado con cepas de *S. aureus* (20).



Figura 3. *Staphylococcus aureus*

### 1.4.2 *Escherichia coli*

*Escherichia coli*, es miembro de la familia *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo Gram negativo, no forma esporas, es móvil (flagelos parítricos), miden  $0.5\mu$  de ancho por  $3\mu$  de largo. Son catalasa positiva, oxidasa negativos, reducen nitratos a nitritos y producen vitamina B y K.

Su estructura antigénica consta de antígeno capsular (antígeno “K”), antígeno somático (antígeno “O”) que es de constitución polisacárida y el antígeno flagelar (antígeno “H”) constitución proteica (22).

Pertenece a un grupo de bacterias presentes en el intestino del ser humano y animales, siendo, la gran mayoría, inocuas en ellos. Sin embargo, hay algunas cepas de *E. coli* productoras de toxinas, llamadas verotoxinas o toxinas de tipo *shiga* que pueden causar cuadros gastrointestinales graves en el ser humano (23).

Se reconocen 6 grupos:

- ✓ *Escherichia coli* entero patógena (ECEP)
- ✓ *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET)
- ✓ *Escherichia coli* entero invasiva (ECEI)
- ✓ *Escherichia coli* entero hemorrágica o verotoxigénica (ECEH)



- ✓ *Escherichia coli entero agregativa (ECEA)*
- ✓ *Escherichia coli adherencia difusa (ECAD) (24)*



# CAPÍTULO

## II



---

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 MATERIALES

#### 2.1.1 ESTÁNDARES

Los estándares usados fueron: Alfa – pineno, Beta –pineno, Limoneno, Linalol y Mentona adquiridos a Sigma – Aldrich (Alemania)

#### 2.1.2 SOLVENTES

Los solventes empleados fueron Dimetilsulfóxido 99% *dried* adquirido a laboratorios Merck kGaA (Alemania). Tween 20 adquirido a Sigma – Aldrich (St. Louis, USA)

### 2.2 RECOLECCIÓN DE LA PLANTA.

#### 2.2.1 Método

**2.2.1.1 RECOLECCIÓN:** *Morella parvifolia* fue recolectada vía a Loja, en la población de Jima con las coordenadas:  $x = 720042$ ;  $y = 9'649.033$ , a una altitud de 3337 msnm. *Clinopodium tenellum* se obtuvo en el Mercado 10 de Agosto de la ciudad de Cuenca ubicado en la calle Larga y General Torres.

**2.2.1.2 SELECCIÓN:** Se separaron las hojas frescas en buen estado, es decir, sin lesión o alteración en su color y libre de materia extraña.

**2.2.1.3 LAVADO:** Las hojas seleccionadas se lavaron, tanto en el haz como en el envés con una corriente de agua potable. Posteriormente en un recipiente plástico se colocaron las hojas y agua destilada dejándose en reposo por diez minutos. Transcurrido el tiempo se escurrieron las hojas y se procedió a colocar sobre una base de madera y malla de acero inoxidable cubierta con papel periódico, por 24 horas para eliminar parte del agua.

**2.2.1.4 SECADO:** Las hojas colocadas sobre papel periódico se pasaron a una bandeja de acero inoxidable sanitizada y colocaron en la estufa Pro 3 (Cuenca, Ecuador) a 40°C por 24 horas aproximadamente. Posteriormente se pasaron a una funda de papel y se procedió a pesar en balanza analítica el material para su procesamiento inmediato.



Figura 5. Secado de *Huarmi Poleo*

## 2.3 EXTRACCION DE LOS ACEITES ESENCIALES

### 2.3.1 MÉTODO - DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR:

Se llevó a cabo la extracción de los aceites esenciales, utilizando el método de arrastre de vapor de agua durante 3 horas manejando una trampa de tipo Clevenger para separar aceites esenciales (25) (26).

- a) De las hojas previamente preparadas se pesaron 100 g para el procedimiento, luego se pasaron a un balón de vidrio de fondo redondo al que también se adicionó 1 litro de agua destilada junto con esferas de vidrio para evitar ebulliciones bruscas al someter a calor.
- b) Se armó el equipo para la destilación, colocando el balón sobre una manta calefactora sosteniendo el balón con una pinza, se colocó la trampa tipo Clevenger, se cerró con un refrigerante sostenido por otra pinza, (uniones deben ser engrasadas para mejor sellado).

- c) Se conectó la manta, se esperó a que comience la ebullición. Una vez que comenzó se fue controlando el proceso de calentamiento en series de 20 minutos encendido y 5 minutos apagado para evitar ebulliciones bruscas, por un periodo de 3 horas.
- d) Terminado el periodo se apagó la manta y se dejó enfriar por un lapso de tiempo, se recogió el aceite en la bureta del sistema de destilación.
- e) Se añadió sulfato de sodio anhidro para extraer fracciones de agua, luego se centrifugó (centrífuga, Sigma) a 3000 r.p.m. por 5 minutos y pasó el aceite a un tubo limpio con la ayuda de una pipeta Pasteur, finalmente se le adicionó una corriente de nitrógeno para evitar la oxidación, sellando bien, almacenándolo en refrigerador y protegido de la luz.



Figura 6. Equipo de destilación por arrastre de vapor

## 2.4 DENSIDAD

### 2.4.1 MÉTODO

En una balanza analítica (Boeco) se procedió a pesar el picnómetro (2 ml), previamente lavado y secado en estufa a 35 °C. Luego de esto, se pesó el picnómetro que contenían el aceite esencial.

Con estos datos obtenidos se procedió a realizar los cálculos para obtener la densidad de los aceites esenciales.

<i>Clinopodium tenellum</i>	<i>Morella parvifolia</i>
Peso picnómetro de 2.03 ml: 5,6047 g. Peso picnómetro/muestra: 7,4462 g. Peso muestra: 1,8415 g.	Peso picnómetro de 2.00 ml: 5,7488 g. Peso picnómetro/muestra: 7,5245 g. Peso muestra: 1,7757 g.
$\delta = \frac{m(g)}{V(ml)}$	
$\delta = \frac{1,8415}{2,03} = 0.9071 \text{ g/ml}$	$\delta = \frac{1,7757}{2,00} = 0.8878 \text{ g/ml}$

## 2.5 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

### 2.5.1 MÉTODO

#### 2.5.1.1 Preparación del Aceite Esencial.

Se preparó el aceite esencial a una concentración de 20.68 mg/ml para *Clinopodium tenellum* y una concentración de 20 mg/ml para *Morella parvifolia*:

<i>Clinopodium tenellum</i>		<i>Morella parvifolia</i>	
1000 µl	907.1 mg	1000 µl	887.8 mg
X=22.80 µl AE	20.68 mg	X=22.5 µl AE	20 mg
22.80 µl AE+ 977.2 µl DMSO		22.5 µl AE + 977.5 µl DMSO	

AE: Aceite esencial

### 2.5.1.2 Microorganismos.

Se utilizaron dos cepas bacterianas, una Gram negativa: *Escherichia coli* ATCC 25922 (*American Type Culture Collection*) y otra Gram positiva: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, las que se encontraban en leche descremada para su conservación a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  en *biofrizzer*.

### 2.5.1.3 Preparación de medios de cultivo

- **Caldo tripticasa soya**

Es un medio nutritivo que favorece el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, en especial las bacterias anaerobias facultativas y aerobias comunes. Debido a su capacidad para favorecer el crecimiento, esta fórmula fue adoptada por la Farmacopea de Estados Unidos (USP) y la Farmacopea Europea (EP) como medio de prueba de esterilidad. (27)

**Nota:** Al caldo se le añadió 1% de Tween 20.

### 2.5.1.4 Cultivo “overnight”

Se seleccionó y retiró la cepa bacteriana del *biofrizzer*, colocando en la estufa por 15 minutos a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Luego se atemperó las cajas petri con agar tripticasa soya (TSA). Se sembró 100  $\mu\text{l}$  de la cepa bacteriana por estriado bajo cámara de flujo laminar, se incubó a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

### 2.5.1.5 Preparación del inóculo

Del cultivo preparado se tomaron las colonias necesarias para llegar a la concentración requerida. Se colocan en un tubo de agua destilada estéril, homogeneizamos y se procede a leer en el espectrofotómetro a 405 nm, a una lectura de  $0.098 \pm 0,001\text{ } \text{Å}$  (0,5 Mc Farland), del que se va a tomar 93.2  $\mu\text{l}$  + 13.907 ml de caldo de tripticasa soya alcanzando una concentración final de  $5 \times 10^5$  UFC/ml en la placa.

## 2.5.2 Screening

Se emplearon placas de 96 pocillos de fondo plano, de los cuales:

### **Columna 1**

Control positivo: Desde la fila A-D (100 µl medio TSB/1% Tween 20 + 100 µl bacteria)

Control negativo: Desde la fila E-H (200 µl medio TSB/1% Tween)

### **Columna 2- 7**

**Fila A:** 180 µl medio TSB/1% Tween + 20 µl AE/DMSO

**Fila B-H:** 100 µl de medio TSB/1%Tween

### **Columna 8- 10**

**Fila A:** 180 µl medio TSB/1%Tween + 20 µl DMSO

**Fila B-H:** 100 µl de medio TSB/1%Tween

La fila A homogenizamos (40 veces) y pasamos 100 µl del homogenizado a B, de B homogenizado pasar 100 µl a C y así sucesivamente hasta H, de H se descartan los 100 µl

En las columnas 2-10 y filas desde A-H añadimos 100 µl de bacteria completando 200 µl en cada pocillo con una concentración de aceite esencial de 1000 a 8 µg/ml.

### **Columna 12**

#### **Filas A-H control antibiótico**

**Fila A.-** 180 µl medio TSB + 20 µl de gentamicina 0,325 mg/ml

**Filas B-H.-** 100 µl de medio TSB.

Fila A homogenizar y pasar 100 µl a B y así hasta H

En toda la columna 12 colocar 100 µl de bacterias completando 200 µl en cada pocillo.

Finalmente, sellar las placas e incubar la placa a 35 °C por 21-23 horas. (28). La técnica fue modificada de acuerdo a las necesidades encontradas.

## 2.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

### 2.6.1 MÉTODO - CROMATOGRAFIA DE GASES

La muestra inyectada se volatiliza en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte no reactivo respecto de la muestra (fase móvil: N<sub>2</sub> o H<sub>2</sub>). El analito pasa a la fase móvil por su presión de vapor, en función de la temperatura y de la afinidad que tenga por la fase estacionaria. La fase estacionaria es un sólido, donde el analito se adsorbe o más comúnmente una capa fina de líquido sobre un soporte sólido donde se disuelve el analito (29).

La caracterización química de los aceites esenciales se desarrolló, usando cromatografía de gases (GC), en un cromatógrafo *Agilent Technologies* 6890 (Estados Unidos de Norteamérica) en una columna DB-5J&W 122 – 5062, (60 m de largo x 0,25 mm de diámetro x 0,25 µm de película). Para la identificación y diferenciación con los estándares adquiridos (Alfa – pineno, Beta –pineno, Limoneno, Linalol, Mentona), con una fase estacionaria de (5%- Fenil) – Metilpolisiloxano la cual soporta altas temperaturas.

El flujo adecuado para el análisis estuvo en 2,2 ml por minuto. Se utilizó una temperatura inicial de 38 °C por dos minutos con una rampa de 10°C por minuto hasta llegar a 160 °C que se mantuvo hasta los 24 minutos.

Con los parámetros antes citados se realizó el corrimiento del solvente (hexano) inyectando una cantidad de 0,2 µl. Un segundo análisis se realizó con cada uno de los patrones, obteniendo de cada uno de ellos un

pico con un tiempo de retención específico. Luego se realizó una mezcla de todos los patrones con el hexano (solvente) obteniendo el cromatograma en el que se basó nuestro análisis.

Finalmente se realizó el corrimiento de los aceites esenciales a una dilución de 1/100.

## 2.7 Procesamiento estadístico

El procesamiento estadístico-matemático se realizó fundamentalmente en el programa *Microsoft Excel*® v. 2011 para *Windows*. En este sentido se calcularon en cada caso pertinente la media, la desviación estándar y el error típico de la media (para los por ciento de inhibición y las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas).

Para la obtención de las concentraciones mínimas inhibitorias, se transformó logarítmicamente la variable concentración de aceite esencial, del control positivo y del control DMSO. Con estos datos se obtuvo el gráfico cartesiano Y (% de inhibición del crecimiento) vs. X (Logaritmo neperiano de la concentración de inhibidor). Del mismo se seleccionaron los puntos más adecuados para trazar la recta de mejor ajuste por el método de los mínimos cuadrados y que ocupe el rango de 50 % de 90 % de inhibición. El ajuste se evaluó por el coeficiente  $R^2$ , que reporta valores entre 0 a 1; mientras más cercano a 1 mejor será el ajuste de la recta a los puntos experimentales. Las CMI50 y CMI90 se obtuvieron de dicha recta al evaluar cuál será la concentración de aceite esencial en la que se obtiene un 50 % y un 90 % de inhibición.

El coeficiente de variación se calculó dividiendo la desviación estándar entre el valor medio de un conjunto de datos o resultados de réplicas experimentales.

Este se puede emplear para indicar cuan dispersos están los datos alrededor del valor central, por lo que puede utilizarse para indicar cuán





precisa es la metodología empleada en la determinación de la susceptibilidad de las bacterias analizadas al antibiótico y al aceite esencial de cada planta.



# CAPÍTULO

## III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Obtención y caracterización inicial de los aceites esenciales de *C. tenellum* (Huarmi Póleo) y *M. parvifolia* (Laurel de Cera).

La destilación por arrastre de vapor o hidrodestilación es una de las técnicas más empleadas para la obtención de aceites esenciales de las plantas. En el presente estudio mediante este proceder se obtuvieron los aceites de las plantas *Clinopodium tenellum* (“Huarmi Póleo”) y *Morella parvifolia* (“Laurel de Cera”). Las propiedades físico-químicas de estos se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Rendimiento y propiedades físicas de los aceites esenciales obtenidos.

Planta	Peso (g)	Aceite esencial				
		Color	Olor	Índice de refracción	Densidad (g/ml)	Rendimiento (ml/100g)
<i>C. tenellum</i>	100	Amarillo pálido	Mentolado, Agradable.	1,4765	0,9071	0,8
<i>M. parvifolia</i>	100	Amarillo	Picante, penetrante.	1,4852	0,8878	1,0

Algunos autores plantean que los aceites esenciales son incoloros o ligeramente amarillos recién destilados, aunque con posterioridad pueden oxidarse y tomar otras tonalidades como café, amarillo fuerte, verde o marrón, en dependencia de sus componentes que a su vez se relacionan con el metabolismo secundario de las plantas de las que se obtienen (30).

El olor de los aceites esenciales es variado y depende de los compuestos volátiles presentes en ellos. Se describen aromas fuertes, dulces o frutales, floral, alimonados, picantes, agradables, etc (31) (30).

El índice de refracción es un dato físico que se relaciona específicamente con la composición y estructura de cada sustancia traslúcida. Según la ley de Snell este puede obtenerse de forma relativa al comparar la desviación

respecto a la vertical de la trayectoria de un haz de luz al pasar de un medio con un índice de refracción conocido a otro desconocido. Mientras más se diferencien estos índices de refracción mayor será la desviación del haz de luz de la trayectoria original.

En el estudio de los aceites esenciales, el índice de refracción es característico de cada aceite y varía fundamentalmente con el tipo de compuestos químicos presentes, la densidad y la temperatura del medio. Por eso es difícil siquiera reportar para una misma especie de planta un único índice de refracción ya que la composición de su aceite puede variar de acuerdo a múltiples factores fisiológicos y de procedimientos de obtención y procesamiento de las muestras (32)

En este sentido, Hussain et al (33) investigaron el comportamiento de esta variable en cuatro especies de diferentes géneros de la familia *Lamiaceae*, la misma de *Clinopodium* sp. Los resultados fueron variables y se distribuyeron en un rango desde 1,4620 a 1,5050 a una temperatura de 25°C, relativamente cercana a la empleada para las mediciones en esta investigación (20°C). Aunque no se pueden comparar los resultados de manera exacta por las diferencias en las temperaturas en las que se determinaron los parámetros, pudieran indicarnos en parte que los valores de índice de refracción del aceite esencial de *Clinopodium tenellum* están dentro del rango establecido, ya que estos varían levemente con el aumento de temperatura (34). Esto queda apoyado por los resultados de Castilho et al (35), en la especie *Clinopodium ascendens* (Jordan) Sampaio, cuyo aceite esencial obtenido por un método similar tuvo un índice de refracción de 1,475, muy cercano al reportado en este trabajo.

Asimismo por lo general en su estado físico los aceites esenciales derivados de plantas son líquidos oleosos a temperaturas superiores a los 15°C con una densidad inferior a 1,000 g/ml (31) (30).

El rendimiento de la destilación por arrastre de vapor generalmente es bajo, oscila entre 0,2 % y 3 % dependiendo de muchos factores. El tipo de planta, la porción empleada, el estado fisiológico y el procedimiento de la destilación u obtención del material inicial son elementos importantes a considerar en esta variabilidad (36) (37) (38) (31).

### **3.2 Composición química de los aceites esenciales.**

El análisis de los cromatogramas obtenidos para *C. tenellum* y *M. parvifolia* indican una gran variedad de compuestos.

En ambos casos se pudo comprobar la presencia de los cinco patrones disponibles: alfa-pineno, beta-pineno, limoneno, linalol y menthona (Vea los cromatogramas en las figuras 1 y 2).

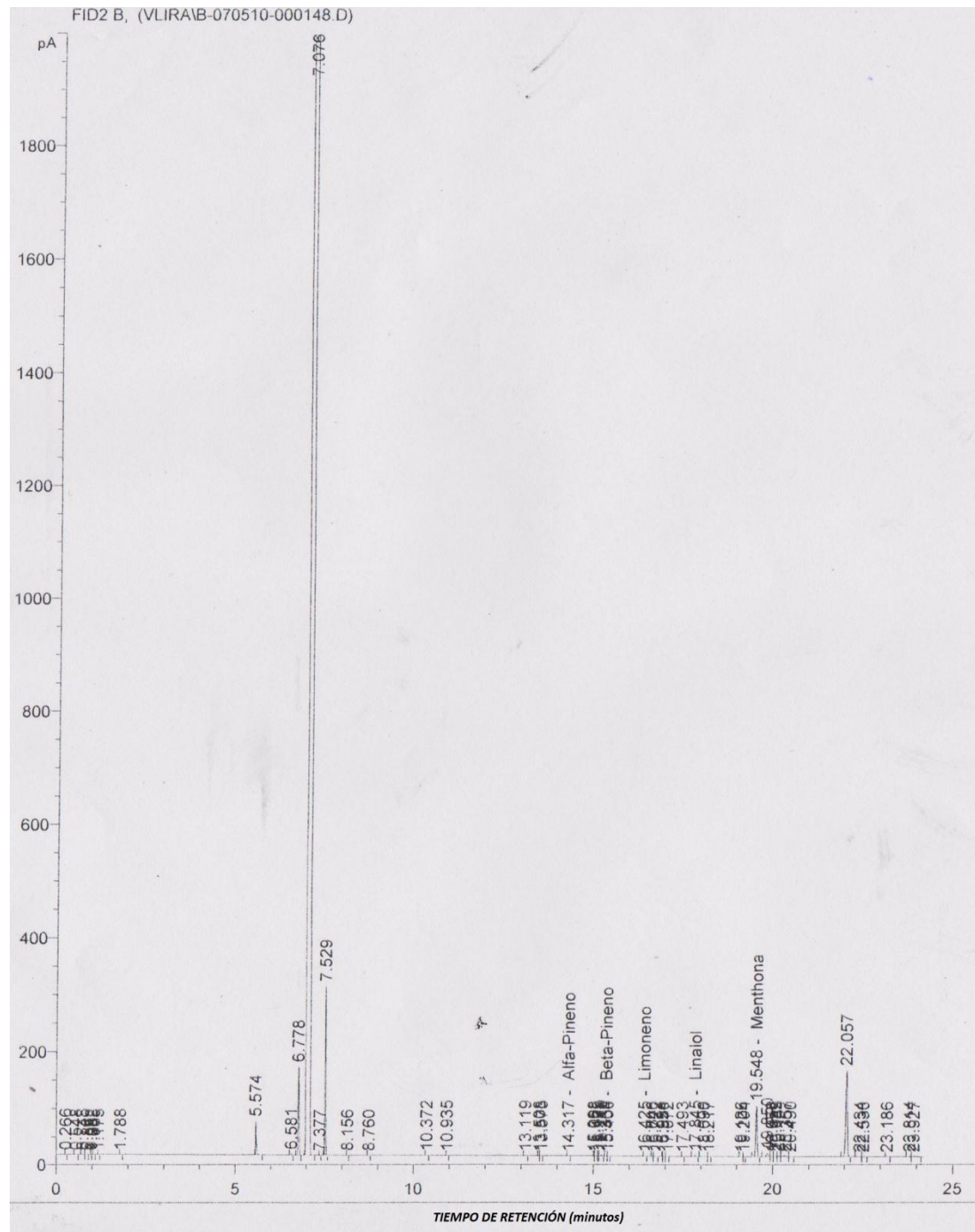


Figura 1. Cromatograma del aceite esencial de Huarmi Poleo (*C. tenellum*).

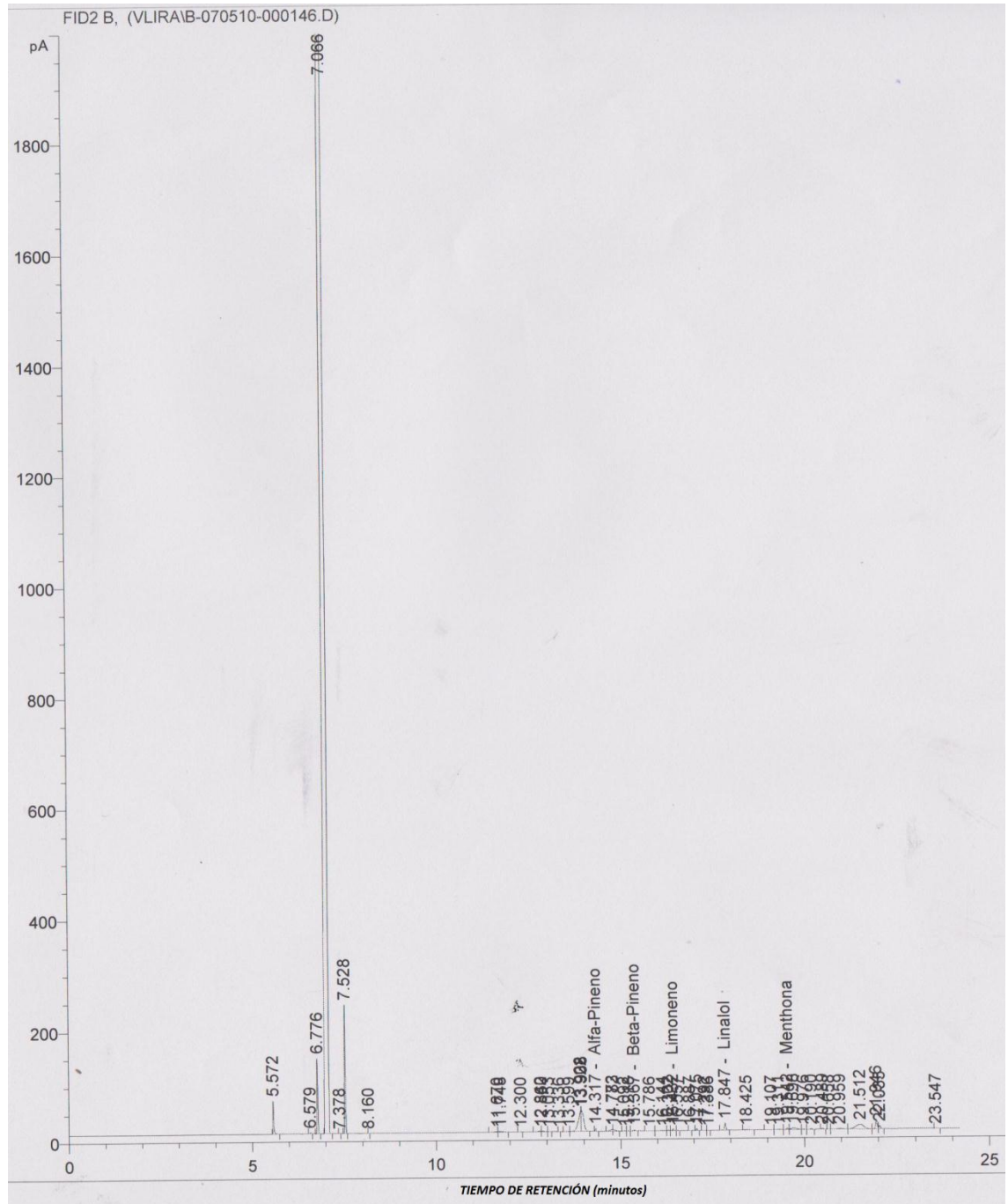


Figura 2. Cromatograma del aceite esencial de Laurel de Cera (*M. parvifolia*).

Considerando que cada pico que se observa en el cromatograma se corresponde con alguno de los compuestos volátiles de las muestras de aceites, se debe entonces suponer que se tienen indicios de al menos

unos 40 compuestos en el aceite de Laurel de Cera y alrededor de 30 compuestos en el Huarmi Poleo.

Aunque en ambos casos se detectaron los compuestos antes mencionados estos no se encuentran en igual proporción en los aceites estudiados. Lo anterior es lógico si se considera que las plantas pertenecen a diferentes familias, lo que puede indicar diferencias fitoquímicas y metabólicas marcadas (Tabla 2).

Tabla 2. Proporción relativa de los compuestos identificados referida al área total en el cromatograma.

Nombre	<i>M. parvifolia</i>		<i>C. tenellum</i>	
	Área (pA*s)	%	Área (pA*s)	%
Alfa-Pineno	9,63	1,24	0,411	0,05
Beta-Pineno	5,91	0,76	0,799	0,10
Limoneno	10,49	1,35	0,585	0,07
Linalol	33,97	4,36	5,17	0,63
Menthona	8,05	1,03	244,9	29,76
Desconocido	130,35	16,73	499,96	60,75
<i>Subtotal*</i>	68,05	8,73	251,865	30,60
<b>Total</b>	779,18	100,00	822,975	100,00
Cantidad de compuestos	aprox. 40		Aprox. 30	

\*: El subtotal está calculado en base a los compuestos identificados solamente.

De la tabla anterior se puede concluir que los compuestos identificados se encuentran relativamente en pequeñas proporciones respecto al total. Solo la menthona en el Huarmi Poleo se localiza en proporciones considerables, cercanas al 30 %, muy superior a los demás componentes

La variedad de compuestos en los aceites esenciales de las especies del género *Clinopodium* es un hecho sugerido por otros autores. De este modo, Gilardoni et al (39) indican que el aceite de *Clinopodium*



*nubigenum* Kunth (Kuntze), obtenido y analizado por un procedimiento similar al presentado en el presente trabajo, presenta un número superior a los 70 compuestos. En este caso la pulegona y la menthona fueron los compuestos identificados en mayor proporción (Pulegona entre 37,11 – 72,79 % y Menthona entre 0,15 – 11,57 %). También fueron identificados en muy pequeñas proporciones el alfa-pineno, el limoneno y el linalol. El beta-pineno no fue detectado.

Por su parte, Castilho et. al. (35) en otra especie del mismo género (*Clinopodium ascendens* (Jordan) Sampaio) también reportó una gran variedad de compuestos siendo los más abundantes un pequeño grupo relacionado estructuralmente como las *cis/trans*-isopulegonas, la pulegona y el isopulegol, representando más del 90 % de los compuestos detectados.

Si bien no se identificó en el presente estudio por falta de este patrón, el compuesto que posee mayor proporción en este aceite esencial bien pudiera tratarse de la pulegona o de alguno de sus derivados. La presencia de menthona en altas concentraciones queda apoyada por los planteamientos anteriores.

En la literatura consultada tampoco se encontraron reportes previos que indiquen con precisión cual es la composición química básica del aceite esencial de *Morella parvifolia*. De hecho, hasta dentro de la misma familia *Myricaceae* se muestran resultados bastante distantes en cuanto a los compuestos constituyentes.

Entre los compuestos más abundantes en la familia *Myricaceae* se han citado a: beta-elemenona, selenina-3,7(11)-dieno, cimeno, n-hexadecanol, acetato de eudesmol, ácido palmítico, mirceno, limoneno, beta-cayofileno, germacreno y delta-cadieno (40) (36) (37) (32).

En el caso particular del género *Morella*, Anofi Omotayo (41) indica que sus aceites esenciales pudieran estar constituidos fundamentalmente de taninos, saponinas, flavonoides, esteroides y moléculas terpenoides. En el caso particular de la especie *Morella pubescens* (Humb. et Bonpl. ex Willd.) Wilbur los compuestos fundamentales resultan ser el germacreno, la selina-3,7(11)-dieno y el delta-cadineno, representando entre ellos aproximadamente un 60 % de la masa total (40). Ninguno de tales compuestos se pudo identificar en el presente trabajo por la carencia de patrones, sin embargo estos resultados indican que los constituyentes volátiles identificados en el aceite esencial de *Morella parvifolia* pudieran no ser los de mayor proporción. Esta suposición queda apoyada cuando se analiza que en el cromatograma aparecen al menos cuatro compuestos no identificados con valores de porcentaje relativo superiores.

### 3.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana.

Los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana se presentan en la tabla 3. Solo el Huarmi Poleo (*Clinopodium tenellum*) mostró una leve actividad bacteriostática frente a *E. coli*.

Tabla 3. Resultados de las CMI50 y CMI90 de los aceites esenciales de Huarmi Poleo y Laurel de Cera frente a los organismos de prueba.

Tratamiento	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	CMI50 ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI90 ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI50 ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI90 ( $\mu\text{g/ml}$ )
DMSO	-----	-----	-----	-----
Gentamicina	9,5 $\pm$ 6,4	34,5 $\pm$ 12,1	-----	-----
<i>C. tenellum</i>	893.26 $\pm$ 279.8	-----	-----	-----
<i>M. parvifolia</i>	-----	-----	-----	-----

CMI50: Concentración a la cual se inhibe el crecimiento bacteriano en un 50 %;

CMI90: Concentración a la cual se inhibe el crecimiento bacteriano en un 90 %;

DMSO: Dimetilsulfóxido (diluyente).

Aunque existe una relación entre la dosis de aceite y porcentaje de inhibición del crecimiento microbiano, se requiere una concentración mucho mayor a 1000  $\mu\text{g/ml}$  para provocar una reducción en un 50 % de la velocidad de crecimiento con el aceite de la especie *Morella parvifolia*. Esta concentración se considera por algunos autores como un límite para identificar si el aceite esencial posee o no actividad antimicrobiana (42). Se requiere una menor del aceite esencial de *Clinopodium tenellum* (Huarmi Poleo) para tener el mismo efecto (Véase Figuras 3 y 4 como ejemplo).

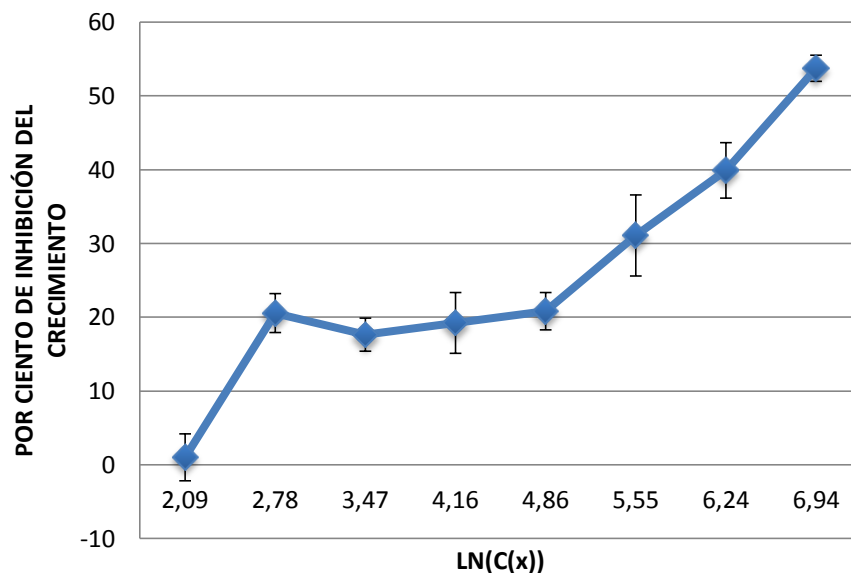


Figura 4. Efecto de la concentración del aceite esencial de *Clinopodium tenellum* sobre el crecimiento microbiano de *E. coli*. Se presentan los valores medios de los por cientos de inhibición  $\pm 1$  Desviación Estándar.

Varios estudios sugieren que los aceites esenciales y diferentes extractos (acuoso, etanólico, acetona, etc.) de diversas plantas de la familia *Lamiaceae* poseen cierta actividad antimicrobiana. No obstante, las investigaciones al respecto parecen concentrarse en las especies del género *Satureja* y *Micromeria* (43) (44) (45) (46) (47). Casualmente, la especie *Clinopodium tenellum* que se investiga acá tiene como nombres sinónimos los de *Micromeria tenella* (Epling) R. Morales y *Satureja tenella*

Epling. Ello hace pensar que taxonómicamente comparte muchos caracteres con las especies de los géneros anteriores.

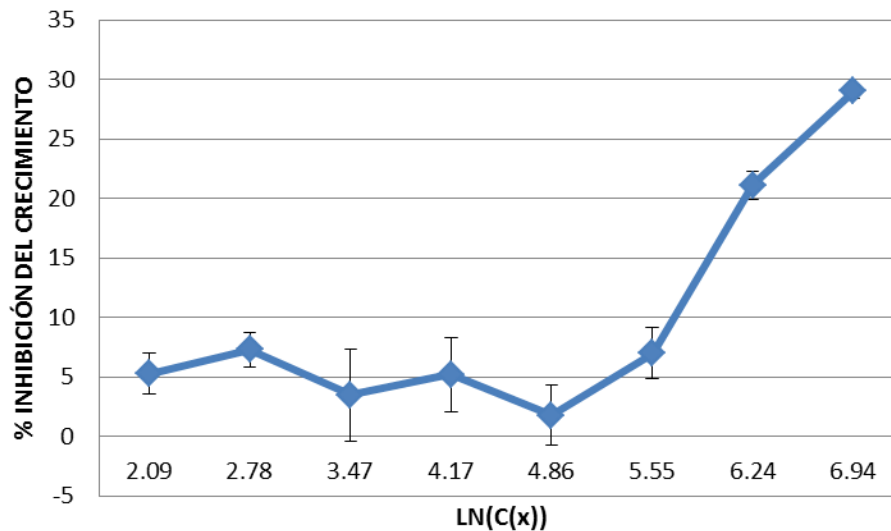


Figura 5. Efecto de la concentración del aceite esencial de *Clinopodium tenellum* sobre el crecimiento microbiano de *S. aureus*. Se presentan los valores medios de los por cientos de inhibición  $\pm 1$  Desviación Estándar.

En la literatura consultada no se encontraron trabajos experimentales sobre las propiedades antimicrobianas de la planta *Clinopodium tenellum* pero sí de algunas especies de este género, siendo las más estudiadas en este sentido algunas variedades de *Clinopodium vulgare*.

La *Clinopodium vulgare* L. es una planta ampliamente utilizada en la medicina folclórica de Bulgaria. En este país, Opalcheva and Obreshkova (48) demostraron una potente actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y en propilen-glicol de esta planta, tanto para microorganismos Gram (+) como Gram (-), e incluso contra microorganismos resistentes a antibióticos aislados de urocultivos. Stefanovic et al (49) corroboraron los resultados anteriores, incluyendo en su estudio a varias cepas de las bacterias *E. coli* y *S. aureus*, las mismas de la presente investigación.

A pesar de lo anterior, la subespecie *Clinopodium vulgare* L. Subsp. *vulgare* L. en Turquía no mostró tal potencia en la inhibición de los mismos patógenos, aunque se debe aclarar que aplicaron una técnica de evaluación diferente (50). Solo los extractos alcohólicos mostraron una ligera actividad frente a las bacterias que se investigan en el presente trabajo.

Los extractos de otra especie del género como *Clinopodium nubigenum* Kuth (Kunze) y el aceite esencial de *Clinopodium ascendens* (Jordan) también muestran resultados en parte discordantes: por un lado el hongo *Candida albicans* es sensible a los extractos de la primera planta mientras que no lo es al aceite esencial de la segunda. Ello parece estar estrechamente relacionado con una diferente composición de metabolitos secundarios.

La búsqueda de información sobre la actividad antimicrobiana de aceites esenciales o extractos de *Morella parvifolia* también dio resultados infructuosos.

Una investigación en *Morella serata* (Lam.) Killick, sugiere que los principales constituyentes de esta especie se corresponden con los taninos, las saponinas, los flavonoides, los esteroides y los terpenoides (41). Otro estudio, esta vez colombiano, sugería que los principales compuestos en *Morella pubescens* (Humb. et Bonpl. ex Willd.) Wilber, pueden ser el germacreno B, la selina-3,7(11)-dieno y el delta-cadineno (40).

Las plantas de la familia *Myricaceae* muestran actividad antibiótica. Una de las más estudiadas, *Myrica gale*, posee actividad contra disímiles patógenos bacterianos y fungos, incluidos la *E. coli* y *S. aureus*, sin embargo la efectividad contra estos últimos depende de la cepa que se emplee (32). Algo similar ocurre con las especies *Myrica rubra*, *Myrica esculenta* y *Myrica serrata* (51) (37).

Varios estudios indican que en estas diferencias influyen un gran número de factores ya sean propios de la planta, el ambiente, la interacción entre la planta y su ambiente, así como las técnicas de recolección y procesamiento de las muestras biológicas, las cepas de microorganismos estudiados y el ensayo de sensibilidad utilizado entre otros muchos (52).

Tales discordancias se presentan también dentro de distintos cultivares de una misma especie, fundamentalmente por la diferente composición en compuestos biológicamente activos frente a los microorganismos evaluados.

Por ejemplo, la especie *Myrica gale* L. ha mostrado diferente actividad y composición química en diferentes países. Nakata et al (32) reportan en Japón que esta planta posee como constituyentes fundamentales a la beta-elemenona, la selina-3,7(11)-dieno, el cimeno, el limoneno, el 1,8-cineole y el beta-pineno; mientras, Sylvestre et al (36) habían planteado anteriormente que sus principales compuestos son el mirceno, limoneno, alfa-felandreno y beta-cariofileno en una variedad canadiense.

La relación entre actividad antimicrobiana y la composición química de los aceites esenciales es un elemento ampliamente aceptado. En este sentido, algunos autores plantean que tal asociación depende fuertemente del contenido de fenoles en la muestra estudiada (53).

En concordancia con esto Dorman and Deans (54) habían demostrado una diferente susceptibilidad de 25 especies de bacterias a 21 compuestos frecuentemente encontrados en seis especies de plantas dos de las cuales pertenecen a las familias estudiadas acá. Los microorganismos evaluados eran mucho más susceptibles a los compuestos fenólicos que a otras estructuras monoterpenoides, indicando que los compuestos con mayor actividad antimicrobiana son el timol, el carvacrol y el alfa-terpineol. Algo similar sugieren los resultados de

Sokovic et al (55) aun empleando una metodología de evaluación diferente.

Se han dado hipótesis que sugieren que tal comportamiento se relaciona con la presencia de grupos oxigenados, los que les confieren cierta solubilidad en agua a los fenoles, aldehídos y cetonas, sobre otros compuestos liposolubles. Esto favorece una mayor difusión en medio acuoso hasta su sitio de acción (55).

Según los autores anteriores, los cinco compuestos identificados acá solo poseen una ligera o modesta actividad, especialmente sobre la *E. coli*.

Con el análisis anterior se puede decir que las bacterias empleadas para el presente estudio son resistentes a los aceites esenciales de *Morella parvifolia*. y *Clinopodium tenellum*. Solo en el caso de la *E. coli* se registra una leve actividad bacteriostática según los criterios de Holetz et al (42), que indican: sin actividad cuando la concentración mínima inhibitoria supera los 1000 µg/ml, es débil cuando se ubica entre los 500 a 1000 µg/ml, moderada cuando está entre 100 µg/ml y 500 µg/ml. Los valores inferiores a 100 µg/ml se consideran con fuerte actividad.

Lo anterior puede deberse a un pobre contenido de compuestos fenólicos y alcoholes que son los que han demostrado frecuentemente mayor actividad antibiótica. No obstante, para corroborar tal suposición debe realizarse un estudio más detallado sobre la composición química de los dos aceites.

Se debe notar que los ensayos de susceptibilidad microbiana empleados en este estudio presentaron una gran variabilidad en sus resultados, con coeficientes de variación superior al 30 % en las estimaciones de las concentraciones mínimas inhibitorias (obsérvese la magnitud de las desviaciones estándar para los valores medios de % de inhibición del crecimiento en las figuras 4 y 5). Por ello los resultados de CMI50 y



CMI90 reportados acá deben tomarse solo como indicios de susceptibilidad más que como valores exactos. Se necesitan estudios más detallados que permitan implementar mejoras en esta metodología de ensayo para reportar resultados más exactos y precisos.





# CAPÍTULO

# IV

## CONCLUSIONES.

- Los aceites esenciales obtenidos de las dos plantas, mostraron propiedades físicas similares a las reportadas en la literatura.
- Ambos aceites presentaron linalol, limoneno, beta-pineno, alfa-pineno y mentona, en diferentes proporciones poco importantes. Solo la mentona se encontró en cantidades apreciables en el aceite esencial de *Clinopodium tenellum*.
- El aceite esencial de *Morella parvifolia* no mostró actividad antibacteriana frente a los microorganismos estudiados.
- El aceite esencial de *Clinopodium tenellum*, solo mostró una leve actividad bacteriostática frente a la *Escherichia coli*. Esto pudiera estar asociado a la presencia de mentona y de otro compuesto no identificado los que se encuentran en mucha mayor cantidad que los demás.



## RECOMENDACIONES.

- Realizar un estudio más detallado sobre la composición química del aceite esencial de *C. tenellum*.
- El aceite esencial de *C. tenellum* debe ser evaluada su capacidad antibacteriana frente a una mayor variedad de microorganismos.



# ANEXOS

**ANEXO 1.**
**ESQUEMA EN PLACA DE MICRODILUCIÓN**

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>
<b>A</b>	100 µl TSB +100µl B	180 µl TSB+20µl AE/DMSO + 100µl B	180 µl TSB+20µl AE/DMSO + 100µl B	180 µl TSB+20µl AE/DMSO + 100µl B	180 µl TSB+20µl PATRON + 100µl B	180 µl TSB+20µl PATRON + 100µl B	180 µl TSB+20µl PATRON + 100µl B	180µl TSB + 20µl DMSO + 100µl B	180µl TSB + 20µl DMSO + 100µl B	180µl TSB + 20µl DMSO + 100µl B	----	180µl TSB + 20µlG +100µl B
<b>B</b>	100 µl TSB +100µl B	100µl TSB +100µl2A +100µl B	100µl TSB +100µl3A +100µl B	100µl TSB +100µl4A +100µl B	100µl TSB +100µl5A +100µl B	100µl TSB +100µl6A +100µl B	100µl TSB +100µl7A +100µl B	100µl TSB +100µl8A +100µl B	100µl TSB +100µl9A +100µl B	100µl TSB +100µl10A +100µl B	----	100µl TSB +100µl12A +100µl B
<b>C</b>	100 µl TSB +100µl B	100µl TSB +100µl2B +100µl B	100µl TSB +100µl3B +100µl B	100µl TSB +100µl4B +100µl B	100µl TSB +100µl5B +100µl B	100µl TSB +100µl6B +100µl B	100µl TSB +100µl7B +100µl B	100µl TSB +100µl8B +100µl B	100µl TSB +100µl9B +100µl B	100µl TSB +100µl10B +100µl B	----	100µl TSB +100µl12B +100µl B
<b>D</b>	100 µl TSB +100µl B	100µl TSB +100µl2C +100µl B	100µl TSB +100µl3C +100µl B	100µl TSB +100µl4C +100µl B	100µl TSB +100µl5C +100µl B	100µl TSB +100µl6C +100µl B	100µl TSB +100µl7C +100µl B	100µl TSB +100µl8C +100µl B	100µl TSB +100µl9C +100µl B	100µl TSB +100µl10C +100µl B	----	100µl TSB +100µl12C +100µl B
<b>E</b>	200µl TSB	100µl TSB +100µl2D +100µl B	100µl TSB +100µl3D +100µl B	100µl TSB +100µl4D +100µl B	100µl TSB +100µl5D +100µl B	100µl TSB +100µl6D +100µl B	100µl TSB +100µl7D +100µl B	100µl TSB +100µl8D +100µl B	100µl TSB +100µl9D +100µl B	100µl TSB +100µl10D +100µl B	----	100µl TSB +100µl12D +100µl B
<b>F</b>	200µl TSB	100µl TSB +100µl2E +100µl B	100µl TSB +100µl3E +100µl B	100µl TSB +100µl4E +100µl B	100µl TSB +100µl5E +100µl B	100µl TSB +100µl6E +100µl B	100µl TSB +100µl7E +100µl B	100µl TSB +100µl8E +100µl B	100µl TSB +100µl9E +100µl B	100µl TSB +100µl10E +100µl B	----	100µl TSB +100µl12E +100µl B
<b>G</b>	200µl TSB	100µl TSB +100µl2F +100µl B	100µl TSB +100µl3F +100µl B	100µl TSB +100µl4F +100µl B	100µl TSB +100µl5F +100µl B	100µl TSB +100µl6F +100µl B	100µl TSB +100µl7F +100µl B	100µl TSB +100µl8F +100µl B	100µl TSB +100µl9F +100µl B	100µl TSB +100µl10F +100µl B	----	100µl TSB +100µl12F +100µl B
<b>H</b>	200µl TSB	100µl TSB +100µl2G +100µl B	100µl TSB +100µl3G +100µl B	100µl TSB +100µl4G +100µl B	100µl TSB +100µl5G +100µl B	100µl TSB +100µl6G +100µl B	100µl TSB +100µl7G +100µl B	100µl TSB +100µl8G +100µl B	100µl TSB +100µl9G +100µl B	100µl TSB +100µl10G +100µl B	----	100µl TSB +100µl12G +100µl B

**NOTA:** Todos los pocillos aceptó en la columna 11 van a quedar con 200 µl.

Interpretación de colores:

NEGRO= MEDIO TSB + TWEEN 20

CELESTE= ACEITE ESENCIAL + DMSO

NARANJA = PATRON CON ACTIVIDAD

VERDE= GENTAMICINA

MORADO= DMSO

ROJO= BACTERIAS

## ANEXO 2.

### MODELO DE PLACA UTILIZADA EN EL ESTUDIO



Fotografía 1. Placa una vez realizado el procedimiento de siembra e incubación a 35° C por 21 – 23 horas.

---

### ANEXO 3.

Cuenca, 28 de Enero del 2014

Una vez revisadas las claves botánicas y cotejada la planta con las colecciones presentes en el Herbario y en las correspondientes páginas web,

Certifico que la muestra botánica entregada por los Señores Juan Pablo Illescas Ortega y María Angélica Zaruma Mochas corresponde a la especie:

*Clinopodium tenellum* (Epling) Harley

Familia Lamiaceae



**Dra. Raffaella Ansaloni**

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. **MINISTERIO DEL AMBIENTE.** *Política y estrategia Nacional de biodiversidad del Ecuador.* Quito : Ministerio del Ambiente, 2010.
2. **Carlos E. Ceron Martinez.** *Plantas Medicinales de los Andes Ecuatorianos.* Quito : s.n., 2006.
3. **Arnaldo Bandon.** *“Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica”.* Buenos Aires Argentina. : Editorial de la Universidad de la Plata, 2000.
4. **Brack A, Heinz P.** *Perú Maravilloso.* Empresa Periodística Nacional SAC. Lima : Epenza, 2002.
5. **ECOCIENCIAS.** Plantas útiles del Ecuador: Una aproximación a sus usos. [En línea] [Citado el: 27 de octubre de 2013.]  
<http://www.terapianeuralecuador.com.ec/component/content/article/62-omar-wladimir-vacas-cruz/234-plantas-iles-del-ecuador-una-aproximaci-a-sus-usos.html>.
6. Naturalista. [En línea] [Citado el: 27 de octubre de 2013.]  
[http://conabio.inaturalist.org/taxa/53204-Clinopodium#cite\\_note-2](http://conabio.inaturalist.org/taxa/53204-Clinopodium#cite_note-2).
7. **Umberto Quattrocchi.** *CRC World Dictionary of Plant Names volumen 1.* 2000.
8. **Layout & design.** Global Biodiversity information facility. [En línea] GIBF data portal, julio de 2013. [Citado el: 28 de noviembre de 2013.] <http://data.gbif.org/welcome.htm>.
9. **Dra. Raffaella Ansaloni.** *Taxonomia de Clinopodium tenellum.* Cuenca, 18 de Diciembre de 2012.
10. **OpEPA.** Organización para la Educación y Protección Ambiental, Colombia. [En línea] 2013. [Citado el: 28 de 10 de 2013.]  
[http://www.opepa.org/index.php?option=com\\_content&task=view&id=357&Itemid=30](http://www.opepa.org/index.php?option=com_content&task=view&id=357&Itemid=30).
11. **BIOCOMERCIO ANDINO.** Base de datos de flora comercializada en el Ecuador. [En línea] 2012. [Citado el: 28 de 10 de 2013.]  
[http://www.biocomercioecuador.ec/recursos/base-de-datos-flora/?pageNum\\_rsFlora=10&totalRows\\_rsFlora=299](http://www.biocomercioecuador.ec/recursos/base-de-datos-flora/?pageNum_rsFlora=10&totalRows_rsFlora=299)  
[http://www.biocomercioecuador.ec/recursos/base-de-datos-flora/?pageNum\\_rsFlora=10&totalRows\\_rsFlora=299](http://www.biocomercioecuador.ec/recursos/base-de-datos-flora/?pageNum_rsFlora=10&totalRows_rsFlora=299).
12. **El semillero.** "Adaptacion, usos, madera, vivero, rendimientos y silvicultura de 95 especies". [En línea] [Citado el: 28 de 10 de 2013.]  
[http://elsemillero.net/nuevo/semillas/laurel\\_cera.html](http://elsemillero.net/nuevo/semillas/laurel_cera.html).



13. **MONTESINOS, FELIPE SERRANO (ETAPA).** *ARBOLES Y ARBUSTOS DEL BOSQUE DE MAZAN.* TOMO I. CUENCA - ECUADOR : EDIBOSCO, 1996. págs. 118 - 119.
14. **Balz, Rodolphe.** *The Healing Power of Essential Oils.* USA : s.n., 1999.
15. **Martínez, Alejandro.** Universidad de Antioquia "Aceites Esenciales". [En línea] 02 de 2003. [Citado el: 06 de 11 de 2013.] <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>.
16. **Ingeniería agroforestal.** Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales. Tema 7. [En línea] [Citado el: 14 de Diciembre de 2012.] <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema7.pdf>.
17. **Esther Flores, Patricia Velasco.** Aceites Esenciales con propiedades antibacterianas. [En línea] 12 de 1999. [Citado el: 05 de 05 de 2013.] <http://www.ops.org.bo/textocompleto/rnbiofa99070701.pdf>.
18. **SENA.** INTRODUCCIÓN A LA INDUSTRIA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS MEDICINALES Y AROMAS. [En línea] 2012. [Citado el: 27 de 11 de 2013.] [http://biblioteca.sena.edu.co/exlibris/aleph/u21\\_1/alephe/www\\_f\\_spa/icon/53722/index.html#](http://biblioteca.sena.edu.co/exlibris/aleph/u21_1/alephe/www_f_spa/icon/53722/index.html#).
19. **DAN, ZEKARIA.** LOS ACEITES ESENCIALES UNA ALTERNATIVA A LOS ANTIMICROBIANOS. [En línea] [Citado el: 21 de 05 de 2013.] [http://www.calier.es/pdf/Microsoft\\_Word\\_-\\_Aceites\\_esen\\_como\\_promotores.pdf](http://www.calier.es/pdf/Microsoft_Word_-_Aceites_esen_como_promotores.pdf).
20. **Murray, P.** *Manual of Clinical Microbiology.* 1995. 6th Edition.
21. **Pahissa, Albert.** *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus.* Valencia : Novoprint, 2009. págs. 16 -18.
22. **Rojas, Sashenka Bonilla.** Escherichia coli. Microbiología General. [En línea] [Citado el: 13 de 11 de 2013.] <http://www.uv.mx/personal/sbonilla/files/2011/06/Escherichia-coli-l.pdf>.
23. **Lourdes Azucena Ruiz Tolentino, Erika Vargas Orozco, Hernández Izaguirre.** E. coli en cuerpos de agua. [En línea] 2012. [Citado el: 02 de octubre de 2013 .] <http://www.turevista.uat.edu.mx/ANO%206%20NUMERO%2022/coli-grupos.htm>.
24. **Chin, James.** *El control de las enfermedades transmisibles.* decimo septima . California : s.n., 2001. págs. 116-128. <http://books.google.com.ec/books?id=HDvEf-SBQvQC&pg=PA116&dq=seis+grupo+de+escherichia+coli&hl=es&sa=X&ei=bYSjUqGjDaaqsQTVwoH4CA&ved=0CDMQ6AEwAQ#v=onepage&q=seis%20grupo%20de%20escherichia%20coli&f=false>.

25. SciELO. *Actividades antibacterianas y antioxidantes del aceite esencial de Artemisia echegarayi Hieron.* [En línea] 12 de 2009. [Citado el: 05 de 05 de 2013.] [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-75412009000400006&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-75412009000400006&script=sci_arttext).
26. DESTÍLACION POR ARRASTRE CON VAPOR. [En línea] [Citado el: 30 de 11 de 2013.] [http://organica1.org/1311/1311\\_10.pdf](http://organica1.org/1311/1311_10.pdf).
27. **BD.** INSTRUCCIONES DE USO – MEDIOS EN FRASCOS LISTOS PARA USAR . [En línea] 02 de 2008. [Citado el: 01 de 12 de 2013.] <https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/BA/ES-BA-257107.pdf>.
28. **Villalta, Claudia.** *Estudio de la Composición química y de la actividad biológica del aceite esencial Siparuna muricata de la familia Siparunaceae de la Provincia de Loja.* Loja : s.n., 2013.
29. Cromatografía de Gases. [En línea] [Citado el: 05 de 05 de 2013.] <http://www.qi.fcen.uba.ar/materias/ai/teoricos/Cromato2012-GC.pdf>.
30. **Paredes Punina, D.O. y Quinatoa Chicaiza.** Desarrollo de un sistema de extracción de aceites esenciales. [En línea] 2010. [Citado el: 03 de diciembre de 2013.] <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1710/1/15T00453.pdf>.
31. **Castillo, Mayra Patricia Ramírez.** Extracción por arrastre de vapor y análisis de propiedades antioxidantes del aceite esencial de romero. [En línea] 10 de Mayo de 2008. <http://catarina.udlap.mx/>.
32. **Nakata, M., Myoda, T., Wakita, Y., Sato, T., Tanahashi, I., Toeda, K. et al.** *Volatile components of essential oil from cultivated Myrica gale var. Tomentosa and its antioxidants and antimicrobial activities.* J. Oleo Sci. : s.n., 2013.
33. **ABDULLAH IJAZ HUSSAIN, FAROOQ ANWAR1, TAHIRA IQBAL.** Antioxidant attributes of four Lamiaceae essential oils. [En línea] 2011. [Citado el: 04 de diciembre de 2013.] [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/43\(2\)/PJB43\(2\)1315.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/43(2)/PJB43(2)1315.pdf).
34. **MetAs y Metrólogos Asociados. , 2:10. Archivo recuperado de:** La Guía MetAsMetrología del refracción. [En línea] 2008. [Citado el: 04 de diciembre de 2013.] <http://www.metAs.com.mx/guiametAs/La-Guia-MetAs-08-12-refracción.pdf>.
35. **Castilho, P., Liu, K., Rodrigues, A.I., Feio, S., Tomi, F., Casanova, J.** *Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Clinopodium ascendens (Jordan) Sampaio from Madeira.* Flavour and Fragrance Journal. 2007. Vol. 22.
36. **Sylvestre, M., Legault, J., Dufour, D., Pichette, A.** Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of Myrica gale L. [En línea] 2005.
-

<http://www.thefreelibrary.com/Chemical+composition+and+anticancer+activity+of+leaf+essential+oil+of...-a0133802202>.

37. **Agnihotri, S., Wakode, S., Ali, M.** *Essential oil of Myrica esculenta Buchottam: composition, antimicrobial and topical anti-inflammatory activities.* 2012. Vol. 26.

38. **Ochoa Pumaylle, K., Paredes Quiroz, L.R., Bejarano Luján, D.L., Silva Paz, R.J.** *Scientia Agropecuaria. Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Senecio graveolens Wedd (Wiskataya).* Trujillo : s.n., 2012. Vol. 3.

39. **Gilardoni, G., Malagon, O., Morocho, V., Negri, R., Tosti, S., Guglielminetti, M. et al.** *Rev Bras Farmacogn. Phytochemical researches and antimicrobial activity of Clinopodium nubigenum Kunth (Kuntze) raw extracts.* 2011. Vol. 21.

40. **Sandoval, J.S., Quijano, C.E., Morales, G., Pino, J.A.** *Composition of the essential oil from the leaves and fruits of Morella pubescens (Humb. et Bonpl. ex Willd) Wilber grown in Colombia. J. Essential Oil Res. Colombia : s.n., 2010. Vol. 22.*

41. **Anofi Otomayo, T.A.** *Medicinal potential of Morella serata (Lam.) Killick (Myricaceae) root extracts: biological and pharmacological activities. BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2013. 13:163..

42. • **Holetz, F.B., Pessin, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A.G., Nakamura, C.V. and Filho B.P.D.** *Screening of some plants used in Brazilian folk medicine for treatment of infectious diseases. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Brasil : s.n., 2002. 97:1027-31..*

43. *Antibacterial activity of essential oil of Micromeria thymifolia and M. albanica (Lamiaceae).* **Marinkovic, B., Vukovic-Gacic, B., Knezevic-Vukcevic, J., Marin, P.P., Sokovic, M. et al.** 2, s.l. : Boccone, 2003, Vol. 16 .

44. *Preliminary antibacterial study on selected Turkish plants (Lamiaceae) against Mycobacterium tuberculosis and search some phenolic compounds.* **Askun, T., Movafo Tekwu, E., Satil, F., Mondanlioglu, S., Aydeniz, H.** 2013. 13:365.

45. *Composition and in vitro antibacterial activity of essential oils from four Satureja species growing in Iran.* **Hadian, J., Akramian, M., Heydari, H., Mumivand, H., Asghari, B.** 2, Iran : s.n., 2012, Vol. 26.

46. *Antibacterial activity of the essential oil of Satureja wiedemanniana against Bacillus species isolated from chicken meat. Foodborne Pathogen Disease.* **Yucel, N. and Aslim, B.** 1, 2011, Vol. 8.

47. *Antimicrobial activity of some Satureja essential oils. Z. Naturforsch C.* **Azaz, D., Demirci, F., Satil, F., Kürkcüoglu, M., Baser, K.H.** 9-10, 2002, Vol. 57.

48. *Antibacterial action of extracts of Clinopodium vulgare L. curative plant. Drug Development And Industrial Pharmacy.* **Opalchenova, G. and Obreshkova, D.** 3, 1999, Vol. 25.
49. *In vitro antibacterial efficacy of Clinopodium vulgare L. extracts and their synergistic interaction with antibiotics. Journal of Medicinal Plants Research.* **Stefanovic, O., Stankovic, M.S., Comic, L.** 17, Serbia : s.n., 2011, Vol. 5.  
[http://www.academicjournals.org/article/article1380715051\\_Stefanovic%20et%20al.pdf](http://www.academicjournals.org/article/article1380715051_Stefanovic%20et%20al.pdf)
50. *Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. Turk J Biol.* **Pelivan Karakas, F., Yildirim, A., Türker, A.** s.l. : Tubitak, 2012, Vol. 36.
51. **Gafner, S., Wolfender, J.L., Movi, S., Hotesttmann A.** *Antifungal and antibacterial chalcones from Myrica serrate. Planta Med.* 1996. Vol. 62.
52. **Baik, Jong Seok, Sang Suk Kim, Jung A Lee.** *Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils .* [En línea] 2008.
53. **Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D., Cork, H.** *The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. Int. J. Food and Microbiol.* 2007. 117:112-9..
54. **Dorman, H.J.D. and Deans, S.G.** *Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oil. J. Appl. Microbiol.* 2000.  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x/pdf>.
55. **Sokovic, M., Glamoclija, J., Marin, P.D., Brkic, D., van Griensven L.J.L.D.** *Antibacterial effects of the essential oil of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. Molecules.* 2010. Vol. 15.
56. slideshare. [En línea] 12 de 12 de 2009. [Citado el: 05 de 05 de 2013.]  
<http://www.slideshare.net/dicoello/aceites-esenciales>.
57. **Loffreda, Lic. Constanza.** MANTRA. [En línea] 2012. [Citado el: 9 de Enero de 2013.]  
<http://www.mantra.com.ar/contterapiasalternativas/aceitesesencialeshistoria.html>.